

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

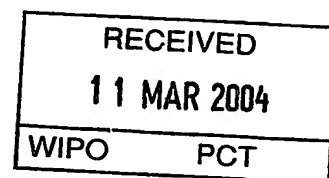
31.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 0 月 3 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 1 8 8 4 6  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 1 8 8 4 6 ]



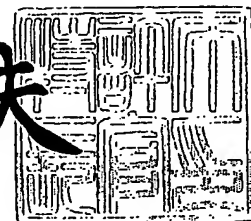
出 願 人            独立行政法人理化学研究所  
Applicant(s):        独立行政法人 科学技術振興機構

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   2 月 2 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH14-151T

【提出日】 平成14年10月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法

【請求項の数】 16

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 - 7 - 2 2 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 横山 茂之

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 - 7 - 2 2 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 白水 美香子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 - 7 - 2 2 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 坂本 恵香

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 - 7 - 2 2 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 坂本 健作

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

## 【代理人】

【識別番号】 100064908

【弁理士】

【氏名又は名称】 志賀 正武

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100101465

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 正和

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100120396

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉浦 秀幸

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100106057

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳井 則子

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (A) 大腸菌由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素と、

(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス (Bacillus) 属、マイコプラズマ (Mycoplasma) 属、又はスタフィロコッカス (Staphylococcus) 属真性細菌由来のサプレッサー tRNA と、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法。

【請求項 2】 上記チロシン誘導体が、3 位置換チロシンである、請求項 1 記載の発現方法。

【請求項 3】 上記 (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) 由来のサプレッサーチロシン tRNA である請求項 1 または 2 に記載の発現方法。

【請求項 4】 (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン及び 195 位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異チロシル tRNA 合成酵素である請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の発現方法。

【請求項 5】 (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン (Y) が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつ 195 位グルタミン (Q) がアラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換された変異チロシル tRNA 合成酵素である請求項 4 に記載の発現方法。

【請求項 6】 上記動物細胞が、哺乳類細胞である請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の発現方法。

【請求項 7】 請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の方法にしたがって発

現させたタンパク質を回収し、精製することを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の製造方法。

【請求項 8】 (A) 大腸菌由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素を動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA を、上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子を上記動物細胞内で発現させる発現ベクター

とを含有し、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることができる動物細胞。

【請求項 9】 上記チロシン誘導体が、3 位置換チロシンである、請求項 8 に記載の動物細胞。

【請求項 10】 上記 (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス由来のサプレッサーチロシン tRNA である請求項 8 または 9 に記載の動物細胞。

【請求項 11】 上記 (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン及び 195 位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異チロシル tRNA 合成酵素である請求項 8 乃至 10 のいずれか一項に記載の動物細胞。

【請求項 12】 上記 (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン (Y) が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつ 195 位グルタミン (Q) がアラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換された変異チロシル tRNA 合成酵素である請求項 11 に記載の動物細胞。

【請求項 13】 哺乳類細胞である請求項 8 乃至 12 のいずれか一項に記載の動物細胞。

【請求項 14】 配列番号 1 の配列を有する DNA。

【請求項 15】 動物細胞内で認識される制御配列から発現可能に配列番号 1 の配列を含有してなる発現ベクター。

【請求項 16】 配列番号 1 の配列を有する DNA が同方向に 9 個配列されてクローン化された、請求項 15 記載の発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質中の所望の部位に、非天然型アミノ酸を取りこませて、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質を発現させる方法、並びに上記タンパク質を発現させるために用いる DNA、発現ベクター、及び動物細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

タンパク質中の所望の位置のアミノ酸残基を、通常のタンパク質合成に関わる 20 種類以外のアミノ酸（以下、非天然型アミノ酸という）で置換した、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質（以下、アロタンパク質ともいう）は、タンパク質の機能・構造解析の有効な手段となり得る。

【0003】

アミノアシル tRNA 合成酵素（以下、aaRS という）はアミノ酸と tRNA とを特異的に結合させる酵素であり、生物種ごとに、一部の例外を除き天然に存在する 20 種類のアミノ酸それぞれに対応して 20 種類存在する。細胞内にはこのような aaRS が基本的にアミノ酸ごとに存在することで、遺伝暗号に割り当てられるアミノ酸の種類が決まっている。例えば、aaRS の一つであるチロシル tRNA 合成酵素（以下、TyrRS という）は、チロシン tRNA（以下、tRNA<sup>Tyr</sup> ということもある）を他のアミノ酸の tRNA から識別してこれにチロシンにしか結合させず、他のアミノ酸とは結合させない。

【0004】

アロタンパク質を生産するための手法としては、従来より、大腸菌内で生産する方法（非特許文献 1）、及び無細胞翻訳系で生産する方法（非特許文献 2）が知られていた。

## 【0005】

非天然アミノ酸を含む21種類のアミノ酸を含んだタンパク質をさらに大量に調製するためには、非天然型アミノ酸を結合する tRNA が、翻訳反応を行なう系の中で専用の aaRS によってアミノアシル化される人工遺伝暗号系を構築することが必要である。

このような人工遺伝暗号系の構築のためには、以下の条件を満たす、aaRS・tRNA の組を見出すことが必要である：

- (1) aaRS は、通常の20種類のアミノ酸のいずれかではなく、所望の非天然型アミノ酸と特異的に反応する aaRS 変異体であること；
- (2) tRNA は、通常の20種類のアミノ酸に割り当てられたコドンではないコドン（例えば、ナンセンスコドンまたは4塩基コドンなど）に割り当てられ、かつ、上記非天然型アミノ酸特異的な aaRS 変異体にのみ認識され、宿主の通常の aaRS には認識されない (orthogonal tRNA) ものであること。

## 【0006】

このような条件を満たす、人工遺伝暗号系として、非天然型アミノ酸を結合してメッセンジャーRNA上のナンセンス・コドンまで運搬する分子（サプレッサー tRNA 分子）と、サプレッサー tRNA 分子に非天然型アミノ酸を結合させる酵素（aaRS）を用いることができる。このメカニズムについては、非特許文献3及び非特許文献4に記載されている。

そして、このメカニズムによる、具体的な人工遺伝暗号系が、大腸菌内の系、及び小麦胚芽抽出液を利用した無細胞タンパク質合成系で確立されている。

すなわち、大腸菌において、任意の指定する部位に非天然型アミノ酸を含有するタンパク質を生産するシステムとしては、O-メチルチロシンを特異的にアミノアシル化するように改変したメタノコッカスジャナシイ (*Methanococcus jannaschii*) 由来の TyrRS 変異体と、同生物由来のチロシン tRNA を改変したアンバーサプレッサー tRNA を発現させ、O-メチルチロシンがアンバーコドンに特異的に導入されることが報告されている（非特許文献3）。

## 【0007】

また、任意の部位に非天然型アミノ酸を含有するタンパク質を小麦胚芽抽出液

中で生産するための a a R S が開発されている（非特許文献 5）。

【0008】

このように、大腸菌や無細胞タンパク質合成系では、アロタンパク質生産系が開発されてきたが、これらをそのまま動物細胞内に用いることはできない。すなわち、大腸菌用に開発されたこれらの分子は、いずれもそれらの分子の性質そのものによって動物細胞内では使用することはできない。動物細胞内で任意の指定する部位に非天然型アミノ酸を含有したタンパク質を合成するためには、別途、適当なサプレッサー tRNA と、このサプレッサー tRNA 分子と非天然型アミノ酸の両方に特異的な a a R S を開発し、かつ、動物細胞内においてそれら分子の発現が実現されなければならない。

【0009】

また、上記小麦胚芽抽出液中での無細胞タンパク合成系で用いられた a a R S は、その基質特異性から考えて動物細胞内で使用可能である予想された。しかし、使用するためには、組み合わせるべきサプレッサー tRNA とその発現系の開発が必要であった。

【0010】

【非特許文献 1】

コイデ (Koide) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings of the National Academy of Sciences)、USA、第 85 巻、1988 年、p. 6237-41

【非特許文献 2】

ノーレン (Noren) ら、サイエンス (Science)、第 244 巻、1989 年、p. 182-8

【非特許文献 3】

ワング (Wang) ら、サイエンス (Science)、第 292 巻、2001 年、p. 498-500

【非特許文献 4】

ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of American Chemical Society)、第 124 巻、2002 年、p. 1836-1837



## 【非特許文献 5】

キガ (Kiga) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings of the National Academy of Sciences)、USA、第 99 巻、2002 年 7 月 23 日、p. 9715-9723

## 【0011】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、動物細胞内における、非天然アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法、並びに上記タンパク質を発現させるために用いる DNA、発現ベクター、及び動物細胞を提供することを目的とする。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、下記の発現方法を提供する。

(1) (A) 大腸菌由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素と、

(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA と、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法。

(2) 上記チロシン誘導体が、3 位置換チロシンである (1) 項に記載の発現方法。

(3) (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のサプレッサーチロシン tRNA である (1) 又は (2) 項に記載の発現方法。

(4) (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン及び 195 位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異チロシル tRNA 合成酵素である (

1) ~ (3) のいずれか一項に記載の発現方法。

(5) (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン (Y) が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつ 195 位グルタミン (Q) がアラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換された変異チロシル tRNA 合成酵素である (4) 項に記載の発現方法。

(6) 動物細胞が哺乳類細胞である (1) ~ (5) 項のいずれか一項に記載の発現方法。

また、本発明は下記のタンパク質製造方法も提供する。

(7) (1) ~ (6) のいずれか一項に記載の方法にしたがって発現させたタンパク質を回収し、精製することを特徴とする、非天然型アミノ酸が取りこまれたタンパク質の製造方法。

また、本発明は下記の動物細胞も提供する。

(8) (A) 大腸菌由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素を動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA を、上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子を上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

とを含有し、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることができる動物細胞。

(9) 上記チロシン誘導体が、3 位置換チロシンである (8) 項に記載の動物細胞。

(10) (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のサプレッサーチロシン tRNA である (8) 又は (9) 項に記載の動物細胞。

(11) (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン及び 195 位

グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異チロシル tRNA 合成酵素である  
(8) ~ (10) 項のいずれか一項に記載の動物細胞。

(12) (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、37 位チロシン (Y) が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつ 195 位グルタミン (Q) がアラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換された変異チロシル tRNA 合成酵素である (11) 項に記載の動物細胞。

(13) 哺乳類細胞である (8) ~ (12) 項のいずれか一項に記載の動物細胞。

また本発明は、下記の DNA 及び発現ベクターも提供する。

(14) 配列番号 1 の配列を有する DNA。

(15) 動物細胞内で認識される制御配列から発現可能に配列番号 1 の配列を含有してなる発現ベクター。

(16) 配列番号 1 の配列を有する DNA が同方向に 9 個配列されてクローン化された、(15) 記載の発現ベクター。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の発現方法は、

(A) 原核生物由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素と、

(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA と、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置にチロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法である。

#### 【0014】

次に、本発明の発現方法で用いられる、変異チロシル tRNA 合成酵素（以下、変異 Ty r R S という）、サプレッサー tRNA について詳述する。

#### 【0015】

##### (1) 変異 Ty r R S

本発明で用いられる変異 Ty r R S は、アミノ酸として、チロシン誘導体の特異的に認識し、かつ tRNA として、併用するサプレッサー tRNA を特異的に認識して、チロシン誘導体が結合したサプレッサー tRNA を生成させることができる大腸菌由来 Ty r R S の変異体である。大腸菌としては、K12 株、B 株を挙げることができる。

大腸菌由来の Ty r R S（野生型）は、真核生物のチロシン tRNA と反応せず、大腸菌由来のチロシン tRNA は真核生物の Ty r R S と反応しない。

#### 【0016】

上記チロシン誘導体としては、チロシンのフェニル基の 3 位に置換基を有する 3 位置換チロシンが挙げられ、中でも、3-ヨードチロシン、3-ブロモチロシンなどの、3-ハロゲン化チロシンが挙げられる。これらはそれ自体で生理活性を有する非天然型アミノ酸であり、タンパク質の部位特異的ラベルの標的部位ともなるので、3-ハロゲン化チロシンを組み込んだタンパク質は、タンパク質機能・構造解析の材料として有用であり、また創薬のターゲットともなる可能性がある。

#### 【0017】

大腸菌の Ty r R S（野生型）のアミノ酸配列（配列番号 29）を 1 文字表記で図 8 に示す。

本発明に用いられる変異 Ty r R S は、例えば、すでに知られている他の Ty r R S とチロシル AMP の複合体との 3-D 構造データ（例えば、Brick ら、J. Mol. Bio., 第 208 巻（1988）p. 83 に記載されている 3-D 構造データ）から得られるチロシル AMP を認識する位置を参照した上で、図 8 の配列の中で、チロシン誘導体を認識する変異を導入すべき位置を推定して、後述する周知の部位特異的に変異を導入する方法により、得ることができる。

そして、好ましくは、本発明に用いられる変異 Ty r R S としては、この配列

の中で、少なくとも、37位のチロシン (Y) と195位のグルタミン (Q) を他のアミノ酸で部位特異的に置換して、3-ハロゲン化チロシンへの特異性を付与した変異体が挙げられる (非特許文献5参照)。

### 【0018】

さらに好ましくは、37位チロシン (Y) が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつ195位グルタミン (Q) がアラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換されたものを用いることができる。これらの変異により3-ヨード-L-チロシンへの特異性が高められることを検証した結果を、表1に示す。表1は、アミノアシル化反応の反応産物の1つであるピロリン酸をピロホスファターゼで分解して生産される無機リン酸を定量するロイドらの方法 (Lloydら、Nucleic Acids Research vol23(1995) pp2886-2892) を簡略化し、無機リンをBiomol green (フナコシ) を使用して検出することで、アミノアシル化反応の測定を行なったものである。

### 【0019】

【表1】

チロシン、3-ヨードチロシンでの TyrRS 変異体の活性  
アミノ酸

酵素	アミノ酸		酵素	アミノ酸	
	チロシン	3-ヨード-L-チロシン		チロシン	3-ヨード-L-チロシン
野生型 (V37, Q195)	+++	-	V37	+++	+++
A37A195	-	-	I37A195	+	+
A37C195	+	++	I37C195	-	-
A37N195	-	-	I37N195	-	-
A37S195	+	+	I37S195	-	-
V37A195	+	++	L37A195	+	-
V37C195	+	++	L37C195	+	+
V37N195	+	++	L37N195	+	-
V37S195	++	++	L37S195	-	-

「+++」: 酵素濃度 0.05  $\mu$ M で活性が検出されたことを示す。

「++」: 酵素濃度 0.25  $\mu$ M で活性が検出されたことを示す。

「+」: 酵素濃度 0.25  $\mu$ M で、「++」よりも低い活性が検出されたことを示す。

「-」: 酵素濃度 0.25  $\mu$ M で活性が検出されないことを示す。

### 【0020】

表1の結果から、中でも、37位がバリンで195位がシステイン (V37C195と称する) の変異体、37位がバリンで195位がアスパラギン (V37N195と称する) の変異体、37位がバリンで195位がアラニン (V37A

195と称する)の変異体、37位がアラニンで195位がシステイン(A37C195と称する)の変異体が特に好ましい。

#### 【0021】

次に、これらの変異体を製造する方法としては、公知の遺伝子操作技術により行なうのが好ましい。例えば、目的のアミノ酸の位置をコードする塩基配列を改変すべきアミノ酸をコードする塩基配列に置換したプライマーを用いて、改変すべきアミノ酸をコードする塩基配列に置換したDNAを増幅させて、増幅させたDNA断片を結合させて、全長のa a R Sの変異体をコードするDNAを得て、これを大腸菌などの宿主細胞を用いて発現させることにより簡便に製造することができる。この方法において使用するプライマーとしては20～70塩基、好ましくは20～50塩基程度である。このプライマーは改変前の元の塩基配列とは1～3塩基がミスマッチとなるので、比較的長いもの、例えば20塩基以上のものを使用するのが好ましい。

#### 【0022】

より具体的に示すと、非特許文献5に記載された方法にしたがって、大腸菌ゲノムDNAを鋳型とし、次のプライマー(1)、(2)を用いたPCRによって増幅した断片を、NdeI及びHindIIIで切断した後に、pET26bのNdeI-HindIII部位に組み込むことで、TyrRSの発現ベクターpRT-YRSを作製する。大腸菌ゲノムDNAを鋳型にするとは、0.1mL程度の大腸菌培養液から回収した大腸菌を95℃で10分間加熱したものをPCR反応液に加えることである。

#### 【0023】

プライマー(1): GGAATTCATATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAACAATTGCAAG  
(配列番号2)

#### 【0024】

プライマー(2): GCCGAAGCTTGTCGACTTTCCAGCAAATCAGACAGTAATTCTTTTACCG  
(配列番号3)

#### 【0025】

次に37位及び195位のアミノ酸を部位特異的に改変する方法の一例を説明

する。

まず、37位または195位の1箇所のみのアミノ酸の置換体を作製する。37位及び195位それぞれの1個のアミノ酸の置換体をコードするDNA配列を作製するために使用するプライマー(3)から(8)は以下の通りである。

【0026】

プライマー(3): AGGATCGAAGCCGCAAGCGAGCGGATCGGGCCTTGCGCC

(配列番号4)

【0027】

プライマー(4): AGGATCGAAGCCGCAMNNGAGCGGATCGGGCCTTGCGCC

(配列番号5)

【0028】

MはCまたはAを示し、NはAまたはCまたはGまたはTを示す。

【0029】

プライマー(5): ACGGTGTGGTGCTGTCTATTGGTGGTTCTGACC

(配列番号6)

【0030】

プライマー(6): ACGGTGTGGTGCTGGCAATTGGTGGTTCTGACC

(配列番号7)

【0031】

プライマー(7): ACGGTGTGGTGCTGAACATTGGTGGTTCTGACC

(配列番号8)

【0032】

プライマー(8): ACGGTGTGGTGCTGTGCATTGGTGGTTCTGACC

(配列番号9)

【0033】

次に、37位及び195位の両方のアミノ酸が改変された二アミノ酸置換体を作製する。

上記の工程で作製した37位および195位それぞれの一アミノ酸置換体をコードするプラスミドから、プライマーを用いたオーバーラップ・エクステンション

シ法で二アミノ酸置換体をコードする DNA 配列を作製し、p E T - Y R S の Nd e I - BamHI 部位に導入する。オーバーラップ・エクステンション法はプライマー (1) と (10) の組、プライマー (9) と (11) の組をそれぞれ用いて増幅した 2 つの断片を精製し、これらとプライマー (1) と (9) を用いた PCR で増幅することによって行なうことができる。

**【0034】**

プライマー (1) : GGAATTCATATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAACAATTGCAAG  
(配列番号 2)

**【0035】**

プライマー (10) : GATCATCTGGTTAACGGAGAAGTGTTTGCC  
(配列番号 11)

**【0036】**

プライマー (9) : TTCTTCGGATCCAACCAGACTGCGCCGCCTTC  
(配列番号 10)

**【0037】**

プライマー (11) : GACCTTCCTGTGCGATATTGGCAAAC  
(配列番号 12)

**【0038】**

上記工程で得られた完全な変異 DNA フラグメントの各々を、プラスミド p E T - Y R S 内のテンプレートフラグメントのものの位置に挿入し、変異型 t y r R S 遺伝子を含むプラスミドで、ハナハンの方法 (Hanahan, D(J. Mio. Bio., 166, 557-580)) に準じた形質転換法により、各々大腸菌 B L R (D E 3) に導入する。各々のプラスミドを有する形質転換体を単離し培養することにより、変異型 T y r R S を大腸菌内で発現させることができる。

**【0039】**

さらに、変異 T y r R S を製造する方法としては、上記方法に限定されるものではなく、公知のポイントミューテーション技術や、制限酵素により改変断片を導入する方法等、種々の遺伝子操作技術を使用することができる。

**【0040】**



## (2) サプレッサー tRNA

上記変異 T y r R S と組み合わせて使用される、サプレッサー tRNA は、通常の 20 種類のアミノ酸に割り当てられたコドンではないナンセンスコドンに割り当てられ、かつ、上記非天然型アミノ酸特異的な T y r R S 変異体にのみ認識され、宿主の通常の a a R S には認識されない (orthogonal tRNA) という要件を備え、かつ真核細胞中で発現しなければならない。

ここで、ナンセンスコドンとしては、UAG (アンバー)、UAA (オーカー)、UGA (オパール) が挙げられるが、UAG (アンバー) コドンをを用いることが好ましい。

### 【0041】

本発明者らは、まず、上記大腸菌由来の変異 T y r R S と組み合わせるサプレッサー tRNA としては、同じ大腸菌由来のものが適していると考え、この大腸菌由来のサプレッサーチロシン tRNA を、真核細胞内で発現させることを考えた。大腸菌 チロシン tRNA 由来のサプレッサーチロシン tRNA の配列及び構造は、すでに知られている (M.Sprinzl ら、Nucleic Acids Research 17, 1-172(1989))。これを図 2 に示す。

### 【0042】

一般に、真核細胞での tRNA の発現は、tRNA コーディング配列内の 2 つの内部プロモーターを必要とし、そのコンセンサス配列は、ボックス A、ボックス B として知られている。ボックス A のコンセンサス配列 (TRGCNNAGYNGG; 配列番号 13) は、8 位～16 位の TRGCNNAGY と 18 位～19 位の GG であり、ボックス B のコンセンサス配列は 52 位～62 位の GGTTCGANTCC (配列番号 14) であり、図 2 において○で囲んだ配列である。またボックス B のコンセンサス配列は、AGTTCGANTCT (配列番号 20) でもよい。

図 2 に示すように、大腸菌サプレッサーチロシン tRNA は、配列内にボックス B コンセンサス配列は有しているが、ボックス A コンセンサス配列は含まない。よって、この大腸菌サプレッサーチロシン tRNA を真核細胞内で発現させるために、U9 と C10 を A と G で各々置換し、ボックス A のコンセンサス配列を作製し (図 2)、これに伴い生じるミスマッチ塩基対、G10-G25 は、G2

5 C置換で修正した。すると、後述の比較例で示すように、上記変異大腸菌由来 Ty r R S と組み合わせても、サプレッション活性を示さないことがわかった。

#### 【0043】

これに対し、*Bacillus stearothermophilus* のサプレッサーチロシン tRNA では、原核生物由来であるが、そのサプレッサーチロシン tRNA 配列内にボックス B とボックス A を内部に有している (M. Sprinzl ら、*Nucleic Acids Research* 17, 1-172 (1989)) (図 2 参照) ことに着目し、なんら改変を加えなくても真核生物内で発現させることができると考えた。

#### 【0044】

そして実際に、*B. stearothermophilus* 由来のサプレッサーチロシン tRNA を改変せずに動物細胞で導入するためのベクターにクローン化して動物細胞に導入したところ、動物細胞中での発現が確認された (後述の実施例参照)。そして、上記大腸菌の Ty r R S と組み合わせて、サプレッション活性を示すことを確認した (後述の実施例参照)。

#### 【0045】

すなわち、ボックス A 配列とボックス B 配列を有した形で、サプレッサー活性を保持できる原核生物のサプレッサー tRNA は、上記大腸菌由来の変異 Ty r R S と組み合わせて、真核生物内でサプレッサー活性を有することができることを見出した。

#### 【0046】

したがって、本発明の発現方法に用いられるサプレッサー tRNA は、上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下でチロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA である。これらの tRNA の配列については、<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/> または <http://www.staff.uni-bayreuth.de/~btc914/search/> に記載されている。

これらは、原核生物中で機能するサプレッサー tRNA の配列を有し、かつ内部に真核生物において認識される 2 つの内部プロモーターコンセンサス配列を有し、上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下でチロシン誘導体と結合可能な

サプレッサー tRNA である。ここで、「原核生物中で機能するサプレッサー tRNA の配列を有」するとは、原核生物由来のサプレッサー tRNA であって、サプレッサー tRNA として機能するための、ナンセンスコドン（通常アンバーコドン（UAG））に相補的なアンチコドン及び立体構造（L 型構造部分）を保持していることを意味する。また、「内部に真核生物において認識される 2 つの内部プロモーター配列を有」するとは、上記ボックス A のコンセンサス配列（配列番号 13）とボックス B のコンセンサス配列（配列番号 14 または配列番号 20）を内部に含むことを意味する。また、「上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下でチロシン誘導体と結合可能」とは、変異チロシル tRNA 合成酵素により特異的に認識されてチロシン誘導体と結合することができるサプレッサー tRNA であり、通常チロシンと結合するチロシン tRNA 由来のサプレッサー変異体で、チロシン誘導体、好ましくは 3 位置換チロシンと結合可能なものが用いられる。

バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌チロシン tRNA 由来のサプレッサー tRNA の例としては、*Bacillus stearothermophilus* のチロシン tRNA 由来のサプレッサー tRNA、*Bacillus subtilis* のチロシン tRNA 由来のサプレッサー tRNA (<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/>、登録番号 DY1540；E. F. Wawrousek ら、(1984) J. Biol. Chem. 259, 3694-3702 参照)、*Mycoplasma capricolum* のチロシン tRNA 由来のサプレッサー tRNA (<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/>、登録番号 DY1140；Y. Andachi ら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7398-7402 参照)、*Staphylococcus aureus* のチロシン tRNA 由来のサプレッサー tRNA (<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/>、登録番号 DY1480；C. Green、(1993) J. Bacteriol. 175, 5091-5096 参照) が挙げられ、好ましくは *Bacillus stearothermophilus* のチロシン tRNA 由来のサプレッサー tRNA が用いられる。

#### 【0047】

#### (3) 変異 TyrRS、サプレッサー tRNA の動物細胞中での発現

変異 TyrRS を動物細胞中で発現させるためには、いかなる公知の発現系でも用いることができ、例えば市販の pCDNA3.1（インビトロジェン社製）

、pAGE107 (Cytotechnology, 33, (1990))、pAGE103 [J. Biochem. 101, 1307 (1987)]などを用いることができる。また、サプレッサー tRNA はいかなる公知の大腸菌クローニング用ベクターを用いても動物細胞内で発現させることができる。例えば、pBR322 (Sutcliffe, J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3737-3741 (1978)) などを用いることができる。

#### 【0048】

変異 TyrRS については、必要に応じて、誘導発現可能なベクターを用いることができ、たとえば、クロンテック社、インビトロジェン社などから市販されている、テトラサイクリン応答プロモーターを用いることができる。

#### 【0049】

細胞へのベクターの導入方法としては、例えば、電気穿孔法 (Chu, Nucl. Acids Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, Mol. Cell Biol. 7, 2745-2752 (1987))、リポフェクション法 (Derijard, Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, Nature Genetics 5, 22-30 (1993)) などが挙げられる。

#### 【0050】

(4) 非天然型アミノ酸を組み込ませるためのタンパク質

本発明で非天然型アミノ酸を組み込ませるタンパク質の種類は、限定されるものではなく、発現可能ないかなるタンパク質でもよく、異種の組換えタンパク質でもよい。

#### 【0051】

本発明において非天然型アミノ酸を組み込ませる位置にナンセンスコドン (サプレッサー tRNA がアンバーサプレッサーのときはアンバーコドン) を導入することが必要であり、これによりこのナンセンスコドン (アンバーコドン) 部位に特異的に非天然型アミノ酸を組み込むことができる。

#### 【0052】

タンパク質に部位特異的に変異を導入する方法としては、周知の方法を用いることができ、特に限定されないが、Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995)、Zoller, Methods Enzymol. 100, 468-500 (1983)、Kramer, Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456 (1984)、Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492 (1985)

、「細胞工学別冊「新細胞工学実験プロトコール」、秀潤社、241-248頁（1993）」に記載の方法、または「QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit」（ストラタジーン社製）を利用する方法などに準じて、適宜実施することができる。

#### 【0053】

本発明は動物細胞内で発現させることができるので、これまで、大腸菌や無細胞タンパク質系では、発現しない、あるいは発現量が低い、または活性型となるための翻訳後の修飾を受けることができないようなタンパク質へ、非天然型アミノ酸を取りこませることができる。このようなタンパク質としては、当業者には種々のものが知られているが、例えば、ヒト上皮成長因子受容体細胞外ドメイン（H.Ogisoら、Cell, 110, 775-787(2002)）、ヒトGroucho/TLE1タンパク質（L.Pickelesら、Structure 10, 751-761(2002)）、ラット筋肉特異的キナーゼ（J.Tillら、Structure 10, 1187-1196(2002)）などについて、非天然型アミノ酸を取りこんだアロタンパク質を合成することができるが、これらに限定されるものではない。

また、本発明の方法においては、動物細胞内でアロタンパク質を発現させるので、糖鎖と結合した糖タンパク質に非天然型アミノ酸を取りこませることもできる。特に、無細胞タンパク質系における糖鎖付加のパターンが、本来のパターンと異なるようなタイプの糖タンパク質の場合には、本発明の動物細胞内での系は、目的の（本来の）パターンの糖鎖が付加されたアロタンパク質を得るための有効な手段と考えられる。

#### 【0054】

##### （5）宿主

本発明の別の態様は、本発明の発現方法に用いることのできる、組換え動物細胞であって、上記 a a R S、サプレッサー t R N A 及び非天然型アミノ酸を取りこませたい位置にアンバー変異を導入した所望のタンパク質遺伝子を導入した動物細胞である。

本発明に用いられる、宿主の動物細胞としては、遺伝子組換え系が確立されている、哺乳類細胞が好ましい。有用な哺乳動物宿主細胞系の実例は、チャイニー

ズハムスター卵巣 (CHO) とCOS細胞を含む。より特有用な例は、SV40によって形質転換したサル腎臓CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓系(293又は懸濁培養での増殖用にサブクローンした293細胞、Grahamら、J. Gen Virol., 36:59(1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR (CHO、UrlaubとChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)); マウスセルトリー細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980)); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳癌(MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。これらの宿主は、各々発現系が確立されており、適切な宿主細胞の選択は、当業者の技術範囲内である。

これらは、例えば、Molecular Cloning 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)などに記載された方法に準じて行なうことができる。

#### 【0055】

次に、上記この本発明の発現方法によって、非天然型アミノ酸取りこみタンパク質が発現する様子を、図1に従って説明する。図1の枠は、動物細胞(例えばChinese hamster ovary細胞(以下、CHO細胞))の細胞膜を表している。細胞内(枠の内側)では、サプレッサーtRNA (“B. s. tRNA<sup>Tyr</sup>”と表示)とaaRS (“E. coli 変異体 TyrRS”と表示)がそれぞれの発現系から発現している。非天然型アミノ酸である3-ヨード-L-チロシンは培地(枠の外側)中に加えられる。

培地中の3-ヨード-L-チロシンは細胞自身の働きで細胞内に取り込まれ、大腸菌変異体 TyrRSの働きによってB. s. tRNA<sup>Tyr</sup>に結合する。その後、3-ヨード-L-チロシンは、B. s. tRNA<sup>Tyr</sup>によってリボソーム上に運ばれて、ナンセンス・コドン(ここでは、UAGコドン)の翻訳に用いられる。望みの任意の位置に3-ヨード-L-チロシンを含有するタンパク質を生産するためには、タンパク質の遺伝子の該当位置のコドンをUAGに置換した後に、この遺伝子を細胞内で発現させる。

#### 【0056】

こうして、本発明の発現方法によれば、動物細胞内において、目的の位置にチロシン誘導体が組み込まれた目的のタンパク質を発現させることができる。

すなわち、(A) 大腸菌由来の T y r R S の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異 T y r R S を動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(B) 上記変異 T y r R S の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサブレッサー t R N A を、上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを有する動物細胞を、その動物細胞の増殖に適した培地（例えば、C H O 細胞の場合、Opti-MEM I (Gibco BRL社) など）に目的のチロシン誘導体を添加した培地で、適当な条件でインキュベートする。例えば、C H O 細胞の場合は、37℃程度の温度で、24時間程度、インキュベートする。培地内のチロシン誘導体の添加量は、0.1-3 mM 程度、好ましくは 0.3 mM 程度とする。

#### 【0057】

本発明の別の態様は、上記の発現方法にしたがって発現させたタンパク質を回収し、精製する、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の製造方法である。

発現したアロタンパク質は、培地又は宿主細胞溶解物から回収し得る。もし膜に結合しているならば、それは適当な洗剤溶液（例えばTriton-X100）を用いて又は酵素的な切断によってその膜から離すことができる。細胞は、凍結-融解サイクル、音波処理、機械的粉碎、又は細胞溶解剤のような各種の物理的化学的手段によって破碎することができる。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まない、またはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

#### 【0058】

タンパク質の単離・精製としては、生産したタンパク質特有の性質に基づき、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、

電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行なうことができる。

#### 【0059】

本発明の別の態様は、下記の配列番号1の配列を有するDNAである。

AGCGCTCCGGTTTTTCTGTGCTGAACCTCAGGGGACGCCGACACACGTACACGTCGGAGGGGTAGCGAAGTG  
GCTAAACGCGGCGGACTCTAAATCCGCTCCCTTTGGGTTTCGGCGGTTTCAATCCGTCCCCCTCCAGACAAGT  
GCGGTTTTTTTCTCCAGCTCCCG

(配列番号1)

#### 【0060】

この配列番号1の配列は、ヒトのtRNA遺伝子のリーダー配列（配列番号1の塩基1～55）と、*Bacillus stearothermophilus*のチロシンtRNA遺伝子のアンチコドン部分をCUAに置換した上で、末端のCCA配列を削った塩基配列（下線部；配列番号1の塩基56～137）、および転写ターミネーター（配列番号1の塩基138～167）をこの順番に連結した人工的な塩基配列である。

#### 【0061】

配列番号1の配列を有するDNAは、クローニングのため（そのDNAの増幅）又は発現のために複製可能ベクターに挿入し得る。各種のベクターが利用可能である。該ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とし得る。その適切な核酸配列は、各種の手法によって該ベクター内に挿入し得る。一般に、DNAは、当該分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター構成要素は、一般に、制限されることなしに、1以上のシグナル配列、複製の起点、マーカー遺伝子などを含む。これらの1以上の構成要素を含む適当なベクターの構築は、当業者に周知の技術である。

#### 【0062】

このベクターを動物細胞中に導入することにより、サプレッサーtRNAを動物細胞中で発現させることができる。すなわち、配列番号1の配列を含むベクターは、動物細胞内で認識される制御配列として、ボックスA、B及び5'側のリーダー配列を有しているので、ひとたびベクターが動物細胞内に導入されれば、これらの制御配列から、当該サプレッサーtRNAが動物細胞中で発現させるこ



とができる。

したがって、上記非天然型アミノ酸取りこみタンパク質の発現方法に用いることが可能であるばかりでなく、動物細胞中のナンセンス変異のサプレッションが可能にするので、ナンセンス変異に関連する疾患などの遺伝子治療に用いられる可能性がある。

#### 【0063】

クローニングベクターの両方は、選択した宿主細胞の1以上の中でそのベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。また、発現ベクターはそのような配列を含んでもよい。そのような配列は、各種の細菌、酵母、及びウイルスについて良く知られている。各種のウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、又はBPV)は、哺乳動物細胞中のクローニングベクターに有用である。

#### 【0064】

発現及びクローニングベクターは、典型的に選択可能マーカを含む。典型的な選択遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子又はチミジンキナーゼ遺伝子などである。野生型DHFRが用いられる場合に適当な宿主細胞は、Urlaubら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:4216(1980)によって記載されるように製造され且つ増殖された、DHFR活性が不足したCHO細胞系である。

#### 【0065】

組換え脊椎動物細胞培養における合成への適合のために好適な更に他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gethingら、Nature, 293:620-625(1981); Manteiら、Nature, 281:40-46(1979)などに記載されている。

#### 【0066】

遺伝子増幅／発現は、直接試料で、例えば、ここに提供した配列に基づいて、適切に標識したプローブを用いて、通常のサザンブロット法、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロット法[Thomas, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:5201-5205(1980)]、ドットブロッティング(DNA分析)、又はin situハイブリダイゼーションで測定し得る。あるいは、抗体は、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及

びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク質二本鎖を含む特異的二本鎖を認識できるそれを利用し得る。その結果抗体は、標識されて良く、且つ該アッセイは、その二本鎖がその表面上に二本鎖の形成において、該二本鎖に結合した抗体の存在が検出できるように表面に結合される場合、実行し得る。

あるいは遺伝子発現は、細胞の免疫組織学的染色又は組織切片のような免疫学的方法及び遺伝子生成物の発現を直接定量するため、細胞培養又は体液のアッセイによって測定し得る。流体試料の免疫組織学的染色のために有用な抗体は、モノクローナル又はポリクローナルのいずれかとして良く、また何れの哺乳動物においても作製し得る。

#### 【0067】

##### 【実施例】

以下、実施例に基づき、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

本実施例では、32番目のコドンにUAGに置換したRasタンパク質遺伝子をCHO細胞内で発現させて、該当部位に3-ヨードチロシンを含有したRasタンパク質を生産した。

#### 【0068】

##### (1) サプレッサー tRNA

サプレッサー tRNAとして用いたB. s. チロシン tRNAの遺伝子(167残基)の塩基配列は以下の通りである。

AGCGCTCCGGTTTTTCTGTGCTGAACCTCAGGGGACGCCGACACACGTACACGTCGGAGGGGTAGCGAAGTG  
GCTAAACGCGGCGGACTCTAAATCCGCTCCCTTTGGGTTTCGGCGGTTTCAATCCGTCCTCCCTCCAGACAAGT  
GCGGTTTTTTTCTCCAGTCCCG

##### (配列番号1)

この配列は、ヒトのtRNA遺伝子のリーダー配列(H. van Tolら、EMBO J. 6, 35-31(1987))と、Bacillus stearothermophilusのチロシン tRNA遺伝子のアンチコドン部分をCUAに置換した上で、末端のCCA配列を削った塩基配列(下線部)、および転写ターミネーター(H. van Tolら、EMBO J. 6, 35-31(1987))をこの順番

に連結した人工的な塩基配列である。

### 【0069】

この配列番号1の配列を有する一本鎖DNAは、PCRプライマーなどの一本鎖DNAの合成を行なう、広く利用されている商業的サービス（シグマ・ジェノシス・ジャパン株式会社）によって化学合成品として得た。このDNAを鋳型にして、次の（1）（2）の2つのプライマーを用いたPCRによって増幅したDNA断片を、EcoRI及びHindIIIで切断した後に、pBR322のEcoRIとHindIII部位に組み込むことでクローン化を行なった。

プライマー（1）：CACAGAATTCTCGGGAGCTGGAGAAAAAAC（配列番号21）

プライマー（2）：CACAAAGCTTAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG（配列番号22）

そして、*B. stearothermophilus*のサプレッサーチロシン tRNA 遺伝子が同じ方向に9つコピーした遺伝子クラスターを以下の2つのステップにより構築した（図3）。

### 【0070】

まず、3つの異なるプライマーセット1～3のプライマー（1）（2）をそれぞれ用いて、以下の通りのPCRを、GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems)を用いて行なった。

第1の反応は、

第1セットのプライマー（1）：

AGCGAGTGTTAACCCCTGCCTAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG（配列番号23）

第1セットのプライマー（2）：

ACACACCCAGCAGACTGGCGGGAGCTGGAGAAAAAAC（配列番号24）

を用いて、通常の反応条件にてPCRを行ない、配列番号1の配列を有するDNAの上流に、プライマー結合部位（pbs1、配列番号15）を、このDNAの下流に、BstXI-1部位（CCAGCAGACTGG：配列番号17）を有する断片を作製した。

### 【0071】

第2の反応は、

第2セットのプライマー（1）：

ACACACCCAGCAGACTGGAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG (配列番号 2 5)

第 2 セットのプライマー (2) :

ACACACCCAGCTTCCTGGCGGGAGCTGGAGAAAAAAC (配列番号 2 6)

を用いて通常の P C R に用いられる反応条件にて P C R を行ない、配列番号 1 の配列を有する D N A の上流に、B s t X I - 1 部位 (配列番号 1 7) を、この D N A の下流に、他の B s t X I 部位、CCAGCTTCCTGG (B s t X I - 2 ; 配列番号 1 8) を作製した。

#### 【 0 0 7 2 】

第 3 の反応は、

第 3 セットのプライマー (1) :

ACACACCCAGCTTCCTGGAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG (配列番号 2 7)

第 3 セットのプライマー (2) :

CTGCGCGAATATCGTAGTCGCGGGAGCTGGAGAAAAAAC (配列番号 2 8)

を用いて通常の P C R に用いられる反応条件にて P C R を行ない、配列番号 1 の配列を有する D N A の上流に、B s t X I - 2 部位 (配列番号 1 8) 、下流に他のプライマー結合部位 p b s 2 (配列番号 1 6) を有する断片を作製した。

#### 【 0 0 7 3 】

これら 3 つの P C R 産物は、公知の技術によって、リガーゼを用いて互いに連結して、t R N A 遺伝子の 3 つのコピーからなるサブクラスターを作製した。

このサブクラスターを、p b s 1 (配列番号 1 5) の配列に EcoRI 制限部位を生成するための配列が付加されたプライマーと、p b s 2 (配列番号 1 6) の配列に HindIII 制限部位を生成するための配列が付加されたプライマーを用いて、両端部に、各々、EcoRI と HindIII 部位が付加されたサブクラスターの断片として、増幅した。

#### 【 0 0 7 4 】

さらに、同様にして、両端に各々 HindIII と EcoRI 部位が付加された断片、両端に各々 EcoRI と BamHI 部位が付加されたサブクラスターの断片を、作製した。こうして、最終的に、制限部位の異なる組み合わせを有する 3 つのタイプのサブクラスターを作製した。これらのサブクラスター 1 ~ 3 を、リガーゼによって互いに

連結し、さらにpBR322(宝酒造株式会社)のEcoRIとBamHI部位の中にクローン化して、9コピーのBacillus stearothermophilusサプレッサーチロシン t R N A遺伝子を有するプラスミドpBstRNAを作製した。

#### 【 0 0 7 5 】

得られたクローン化断片の構造を図3に示す。

図3において、pbs1、pbs2、BstX-1、およびBstX-2の塩基配列は次の通りである。

pbs1: AGCGAGTGTAAACCCTGCCT (配列番号15)

pbs2: CGACTACGATATTCGCGCAG (配列番号16)

BstX-1: CCAGCAGACTGG (配列番号17)

BstX-2: CCAGCTTCCTGG (配列番号18)

プラスミドpBstRNAは、9コピーのBacillus stearothermophilusサプレッサーチロシン t R N A遺伝子を有するので、動物細胞内でのBacillus stearothermophilusサプレッサーチロシン t R N A遺伝子の発現量を高めることができ、動物細胞内で非天然型タンパク質を発現させるために有用である。

#### 【 0 0 7 6 】

##### (2) 変異 T y r R S

大腸菌 変異体 TyrRS (以下、T y r R S (V 3 7 C 1 9 5) という) の遺伝子の塩基配列は、非特許文献5に記載されている。

上述の方法で、37位または195位のそれぞれのアミノ酸の1個が置換された一アミノ酸置換体をコードするDNA配列を、上記プライマー(3)から(8)を用いて作製した。プライマー(3)及び(4)は、37位の改変のためのものである。またプライマー(5)から(8)は195位の改変のためのものである。

ついで、37位および195位それぞれの一アミノ酸置換体をコードするプラスミドから、プライマー(1)と(10)の組、プライマー(9)と(11)の組をそれぞれ用いて増幅した2つの断片を精製し、これらのプライマー(1)と(9)を用いたPCRで増幅することによって行なった。

PCR増幅物を、ベクターpcDNA4/T0 (Invitrogen社)のマルチプルクローニン

グ部位に挿入してプラスミドpEYSM1を作製した。

#### 【0077】

##### (3) 哺乳類細胞でのアンバーサプレッション

LipofectAMINE 2000(Gibco BRL)の方法に従って、35mmプレート当たり、各プラスミドについて0.5-2  $\mu$ gのDNAを用いてトランスフェクションを行った。Opti-MEM 1(Gibco BRL)を、培地として用いた。細胞抽出物を、トランスフェクションの24時間後に調製し、SDS-PAGEに供し、その後、抗-FLAGM2抗体(Sigma)と、ECL+免疫検出システム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてウェスタンブロッティングを行なった。バンドの強度をイメージアナライザー、LAS-1000plus(富士フィルム)を用いて測定した。ras(Am)産物及び比較のための野生型ras産物(各0.5  $\mu$ g)を、抗-FLAG M2抗体アフィニティゲル(Sigma)を用いて、1から5の培養プレート(100mm径)で各々精製した。液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析(LC-MS)とタンデム質量分析シーケンシングを行なった。

#### 【0078】

##### (4) CHO-Y細胞

TyrRS (V37C195)を安定に保持するCHO-Y細胞を創るため、テトラサイクリンリプレッサータンパク質を構成的に生産するT-REX-CHO細胞(Invitrogen)を、プラスミドpEYSM1でトランスフェクトした。トランスフェクタントは、25  $\mu$ g/mlのゼオシン(Invitrogen)を含む培地で選択し、1  $\mu$ g/mlの存在下で、選択した細胞の、TyrRS (V37C195)の発現を調べて、CHO-Y細胞を得た。アロタンパク質の合成のために、CHO-Y細胞は、ras(Am)とBacillus stearothermophilusサプレッサーチロシン tRNA遺伝子を含むプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、テトラサイクリン(1  $\mu$ g/ml)と3-ヨード-L-チロシン(0.3mM)を培地に添加し、さらに24時間後に細胞抽出物を調製した。

#### 【0079】

##### (5) アンバーコドンに対する、3-ヨード-L-チロシン取りこみ

3-ヨード-L-チロシンのタンパク質中への取りこみのために、以下の2つ

の点を考慮した。第1に、哺乳類細胞は、周囲の環境から、本来のアミノ酸と、それらの種々のアナログを取りこむ、輸送機構を有している。第2に、真核生物と原核生物からの野生型のTyrRSはいずれも、基質として3-ヨード-L-チロシンを認識しない。したがって、3-ヨード-L-チロシンは、おそらく、チロシンの位置に誤った取り込みによる毒性を有していないが、3-ヨードチロシンを認識できる変異のTyrRSは、そのサプレッサー tRNAへの付着に必要である。

我々は、3-ヨード-L-チロシンを効率的に認識し（アミノ酸活性化のための  $K_{cat}/K_m$  値は、 $3.3 \times 10^3 / M/s$ ）、チロシンを十倍低い効率で認識する（ $K_{cat}/K_m$  値は、 $3.2 \times 10^2 / M/s$ ）ことが報告されている、大腸菌TyrRS(V37C195)を用いた。さらに、TyrRS (V37C195) は、野生型酵素についての  $K_{cat}/K_m$  値（ $2.3 \times 10^6 / M/s$ ）と比べて、L-チロシンを10000倍低い効率で活性化する。

#### 【0080】

図5は、アンバーサプレッションの検出のためのウェスタンブロットの写真である。(A)は、3-ヨード-L-チロシン非存在下、(B)は3-ヨード-L-チロシン存在下である。すべてのレーンで、ras(Am)遺伝子が導入された。野生型の大腸菌TyrRS (AとBのレーン1) またはTyrRS (V37C195) (AとBのレーン2) は、Bacillus stearothermophilusサプレッサーチロシン tRNAとともに、CHO細胞内で発現した。3-ヨード-L-チロシン (IY) の存在または非存在、及び発現したTyrRSのタイプはwt (TyrRS野生型)、mut (TyrRS (V37C195)) で表示した。

#### 【0081】

図5に示すように、野生型のTyrRSとTyrRS (V37C195) は、各々、Bacillus stearothermophilusサプレッサーチロシン tRNAと、ras(Am) 遺伝子とともにCHO細胞で発現した。これらの酵素は、同様のレベルで発現した(図5A及び図5B)。3-ヨード-L-チロシン(図5A)の非存在下で、両方の酵素についてアンバーサプレッションが観察されたが、TyrRS (V37C195) のras(Am)産物の収率は、野生型酵素の40%に過ぎなかった。こ

のことは、競合する 3-ヨード-L-チロシンの非存在下でも、TyrRS (V37C195) は、やはり L-チロシンを認識し、アンバー位置にそれを取りこむことを示す。ついで、3-ヨード-L-チロシンを最終濃度 0.3 mM になるように培地に添加した (L-チロシンはそれの 2 倍の濃度で含んでいた (図 5 B))。3-ヨード-L-チロシンのこの濃度は、細胞増殖に、ほとんど影響を与えなかった。

3-ヨード-L-チロシンの存在下で、TyrRS (V37C195) のサプレッション効率は、野生型酵素に匹敵するレベルまで改善され、3-ヨード-L-チロシンが細胞により効率的に取りこまれ、TyrRS (V37C195) による認識を介してタンパク質中に組み込まれたことを示唆した。

#### 【0082】

##### (6) Ras 産物の確認

3-ヨード-L-チロシン取りこみを確認し、それがアンバー位置 (32 位) を占めることを確認するために、Achromobacter プロテアーゼ I (Lys-C) によって分解し、その分解産物であるペプチド混合物を液体クロマトグラフィー質量分析機 (LC-MS) によって解析した。ついで、32 位に取りこまれたアミノ酸をマスキングクロマトグラフィーで、特異的平均質量と、液体クロマトグラフィーリテンションタイムについて解析した (各々、Ser17 から Lys42 までの領域に相当し、ヨードチロシンとチロシンを 32 位に含む 2 つの断片 (各々、IY と Y 断片と称する))。

#### 【0083】

図 6 は、ras 及び ras(Am) 産物の LC-MS 分析の結果を示すグラフである。

図 6 (A) は、ras(Am) 断片 (チャート a) 及び ras 産物 (チャート B) について、UV スペクトルで検出した液体クロマトグラフィーの結果である。

図 6 (B) は、ras(Am) 産物 (チャート a 及び b) 及び ras 産物 (チャート c 及び d) からの、IY 断片について (チャート a 及び c) 及び Y 断片 (チャート b 及び d) の質量スペクトルの結果である。Y 断片は Ras タンパク質の残基 17-42 (SALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRK) からなり、IY 断片は下線の Y が 3-ヨード-L-チロシンに置換されたものである。



図6 (C) は、I Y断片のタンデム質量スペクトルの結果である。N末端からC末端方向の部分配列は、V a l、A s p、G l u、ヨードチロシン及びA s pである。

#### 【0084】

ras(Am)産物の分析において、I Y断片は強く観察され(図6 B、チャートA)、3-ヨード-L-チロシンの効率的取りこみを示した。タンデム質量スペクトルによって決定されたこのI Y断片の部分配列は、ヨードチロシンが32位に実際に取りこまれたことを確認した(図6 C)。他方、Y断片は検出されず(図6 B、チャートb)、3-ヨード-L-チロシンが、32位でのL-チロシンの取りこみを阻害したことを示した。LC-MSデータのさらなる分析は、他の正規のアミノ酸がこの位置に取りこまれなかったことを示した。ヨードチロシンが32位を示すことは、こうして、LC-MS分析により評価された。これに対して、3-ヨード-L-チロシンの存在下で合成されたras(WT)産物については、Y断片は観察された(チャートd)が、I Y断片は観察されなかった(図6、チャートc)。このことは、いずれの誤認識も、チロシンの位置に3-ヨード-L-チロシンを取りこむであろうから、CHO細胞中の内因性のT y r R Sは、3-ヨード-L-チロシンを認識せず、T y r R S (V 3 7 C 1 9 5) は内因性のチロシン t R N Aを認識しないことを示している。

図6に示すように、3-ヨード-L-チロシンを含有するペプチドのピークが検出された(図6 B(a))。他方、もしUAGコドンが3-ヨード-L-チロシン以外のアミノ酸に翻訳されているとするとチロシンに翻訳される可能性が最も高いが、チロシンを含むペプチドは検出されなかった(図6 B(b))。同様に、UAGコドンが他のアミノ酸に翻訳されると生じるはずのペプチドは一切検出されなかった。

#### 【0085】

この解析結果は、生産されたRasタンパク質のほぼ100%が、UAGコドンによって指定された位置に3-ヨード-L-チロシンを含有していることを示しており、本発明が期待通りの効果を与えることが示された。

#### 【0086】

(7) 変異体T y r R Sの誘導可能な発現により制御される3-ヨード-L-チ

### ロシンの条件取りこみ

大腸菌 G1nRS は、テトラサイクリン制御プロモーターから哺乳類で発現し、誘導サプレッションをおこす。我々は、他のタイプのテトラサイクリン制御プロモーターから発現する、Ty rRS (V37C195) 遺伝子を安定に保持する CHO セルライン (CHO-Y S 細胞と称する) を創出した。ras(Am) 遺伝子と Bacillus stearothermophilus サプレッサーチロシン tRNA 遺伝子をついで、CHO-Y S 細胞中に一時的に導入した。

#### 【0087】

図7は、Rasタンパク質の3-ヨード-L-チロシンの取りこみについて、誘導可能なアンバーサプレッションのウェスタンブロットの写真である。ras(Am) 遺伝子は、CHO-Y 細胞に導入された。ras(Am) 遺伝子は、Bacillus stearothermophilus サプレッサーチロシン tRNA とともに (レーン1-3) CHO-Y 細胞に導入された。レーン1は、テトラサイクリンと3-ヨード-L-チロシン添加、レーン2はテトラサイクリンを添加し、3-ヨード-L-チロシン無添加、レーン3はテトラサイクリンも3-ヨード-L-チロシンも添加していない。

#### 【0088】

図7に示すように、Ty rRS (V37C195) は、テトラサイクリンが培地に存在するときに発現した (図7、レーン1及び2) が、インデューサーなしでは発現しなかった (レーン3)。発現レベルは、一時的に細胞中に導入したプラスミドから発現した Ty rRS (V37C195) のレベルの2倍であった。3-ヨード-L-チロシンとテトラサイクリンの両方の存在下で、サプレッション効率30%でras(Am)産物を検出した (レーン1)。ras(Am)産物の質は、CHO-Y 細胞中に同様に生産されるras(WT)の質とともに、LC-MSにより分析し、プラスミドからの Ty rRS (V37C195) 下の質と同一であることが示された。95%を上回るras(Am)産物が、アンバー位置に3-ヨード-L-チロシンを含み、3-ヨード-L-チロシンは、ras(WT)産物中で検出されなかった。

#### 【0089】

他方、3-ヨード-L-チロシン非存在下で (レーン2)、ras(Am)産物は、

ほとんど検出されず、インデューサー非存在下では（レーン3）検出されなかった。これらの観察は、テトラサイクリンが、TyrRS(V37C195)発現の誘導を介して、ras(Am)産物内への3-ヨード-L-チロシン取りこみを有効に条件づけることを示した。図7と図5Aとの比較は、3-ヨード-L-チロシンの非存在下でL-チロシン取りこみが、プラスミドからTyrRS(V37C195)が発現した場合に比べて、著しく低いことを示す。この予想外の結果は、3回以上の独立した実験で観察された。この現象がいかなる機構に基づくものかについては、さらなる研究の課題である。

#### 【0090】

##### [参考例]

##### TyrRS遺伝子とレポーター遺伝子の構築

変異TyrRS(V37C195)遺伝子、ras遺伝子及び上皮成長因子受容体レポーター遺伝子のC末端に、適当なPCRプライマーでこれらの遺伝子を増幅することにより、FLAGタグ(DYKDDDDK)を付加した。PCR産物は、各々、哺乳類細胞での発現のために、ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)(Invitrogen)にクローン化した。TyrRS(V37C195)について、PCR産物も、ベクターpcDNA4/TO(Invitrogen)にクローン化して、テトラサイクリン制御発現のためのプラスミドpRYSM1を作製した。ras遺伝子の部位特異的変異を、変異誘発性プライマーを用いたPCRで行なった。同様に、上皮成長因子受容体の1068位のチロシンコドン、アンバーコドンに変異した。緑色蛍光タンパク質(シアノ蛍光変異)(Clontech)の第1のメチオニン残基を、  
ATGGGAAGTAGTCCATAGTGGTGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCCGCGTC

(アンバーコドンは下線) (配列番号19)

にコードされている短いペプチドに置換し、さらにFLAGタグを、C末端に付加した。得られた遺伝子を、ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)(Invitrogen)にクローン化した。構築された遺伝子の配列を、ABI Prism 377 DNAシーケンサー(Applied Biosystems)を用いて確認した。

#### 【0091】

LipofectAMINE 2000(Gibco BRL)の方法に従って、35mmプレート当たり、

各レポータ遺伝子発現ベクター、および各サプレッサー tRNA 発現ベクター、大腸菌 T y r R S 発現ベクターのそれぞれについて、0.5-2  $\mu$ g の DNA を用いてトランスフェクションを行なった。Opti-MEM 1 (Gibco BRL) を、培地として用いた。細胞抽出物を、トランスフェクションの 24 時間後に調製し、SDS-PAGE に供し、その後、抗-FLAGM2 抗体 (Sigma) と、ECL+免疫検出システム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてウェスタンブロッティングを行なった。バンドの強度をイメージアナライザー、LAS-1000plus (富士フィルム) を用いて測定した。

#### 【0092】

図 4 は、CHO 細胞中のアンバー変異を検出するための、抗 F L A G 抗体を用いたウェスタンブロットのゲルの写真である。

図 4 (A) において、野生型 ras 遺伝子 (レーン 1) または ras (Am) 遺伝子 (レーン 2-8) は、それぞれ F L A G タグが付加されて、CHO 細胞内に導入されたものである。ヒトサプレッサーチロシン tRNA (レーン 3) または大腸菌 T y r R S と大腸菌サプレッサーチロシン tRNA (レーン 4) は CHO 細胞内で発現した。この酵素は、F L A G タグも有している。Bacillus stearothermophilus サプレッサーチロシン tRNA は、大腸菌 T y r R S とともに (レーン 5 及び 8)、または酵素なしで (レーン 7)、CHO 細胞内で発現し、大腸菌 T y r R S 単独でも CHO 細胞内で発現した (レーン 6)。Bacillus stearothermophilus サプレッサーチロシン tRNA は、1 コピーの遺伝子を有するプラスミド (レーン 5 及び 7) から、9 コピーの遺伝子を有するプラスミド (レーン 8) から、発現した。レーン 1 は、2.5  $\mu$ g の細胞抽出物をのせたものであり、レーン 2-8 はその 4 倍量の細胞抽出物をのせたものである。

図 4 (B) において、各々 F L A G タグが付加された、1068 位にアンバーコドンを含む (レーン 1-3)、及び野生型 E G F R 遺伝子 (レーン 2)、上皮成長因子受容体 (E G F R) 遺伝子を CHO 細胞に導入した。Bacillus stearothermophilus サプレッサーチロシン tRNA と大腸菌 T y r R S ペアは細胞中で発現した (レーン 3)。レーン 1 と 2 で大腸菌 T y r R S のレベルで移った弱いバンドは、抗 F L A G 抗体に反応した内因性タンパク質由来である。

#### 【0093】

図4に示すように、*Bacillus stearothermophilus* サプレッサー tRNA と大腸菌 TyrRS の共発現が、15% の効率で ras (Am) 中のアンバー変異のサプレッションをおこすことを見出した (図4A、レーン5)。このサプレッションは、この tRNA (レーン6) または酵素 (レーン7) のいずれかの非存在下では起こらなかった。サプレッションのための大腸菌 TyrRS の必要性は、*Bacillus* サプレッサー チロシン tRNA が、細胞中の内因性の aaRSs によってアミノアシル化されないことを示す。他方で、一時的にトランスフェクトされたプラスミドからの、大腸菌 TyrRS の発現は、それ自体、CHO 細胞の成長速度に殆ど影響を与えない。

#### 【0094】

この異種の系での、チロシン tRNA・TyrRS のペアのサプレッション効率は、ヒトサプレッサーチロシン tRNA の効率または、哺乳類細胞で働く (20-40%) 他のサプレッサー tRNA s の効率よりも、著しく低かった。サプレッション効率は、サプレッサー tRNA 遺伝子を増加させる事により改善できるため、9 コピーの *Bacillus stearothermophilus* サプレッサーチロシン tRNA 遺伝子を有するプラスミドを構築し、CHO 細胞に、大腸菌 TyrRS 遺伝子を有するプラスミドとともに導入した。こうして24%までサプレッション効率を改善した (図4A、レーン8)。この値は、ヒトサプレッサーチロシン tRNA に匹敵するものである。この後、*Bacillus stearothermophilus* サプレッサーチロシン tRNA の発現のためにこのプラスミドを用いた。

#### 【0095】

*Bacillus stearothermophilus* サプレッサーチロシン tRNA と大腸菌 TyrRS とのペアは、ヒト胚性腎293細胞アンバー変異を、CHO 細胞中での効率と同様にサプレッションをおこした。さらに、上皮成長因子受容体遺伝子のアンバー変異は、効率20%でサプレッションを受けた (図4B) が、*Aequorea victoria* 緑蛍光タンパク質遺伝子中のアンバー変異は、同じ効率でサプレッションを受けた。

これらの遺伝子と ras (Am) 遺伝子は、アンバーコドンの周囲に、異なるコドンを持っている。

#### 【0096】

## [比較例]

哺乳類細胞中のアンバーサプレッションに対する、原核生物のチロシン tRNA・TyrRS ペアの発現の必要性

真核細胞での tRNA の発現は、RNA コーディング配列内の 2 つの内部プロモーター (ボックス A と B) を必要とする。大腸菌チロシン tRNA 配列は、ボックス B しか含まないため、U9 と C10 を A と G で各々置換し、ボックス A を作製した (図 2)。その結果得られたミスマッチ塩基対、G10-G25 は、G25 を C に置換して修正した (以下、tRNA<sup>Tyr</sup> (A9G10C25) という)。大腸菌チロシン tRNA の 9 位、10 位、25 位は、3 次元の相互作用に参与しており、L 型構造を支えている。

## 【0097】

CUA アンチコドン を有する tRNA<sup>Tyr</sup> (A9G10C25) の配列を、ヒトチロシン tRNA 遺伝子の 5' フランキング配列に結合した。ヒトサプレッサーチロシン tRNA 遺伝子は、アンバーサプレッションのコントロールと同様に構築した。アンバーサプレッションを解析するため、野生型 c-Ha-Ras についてトランケートした、合成 ras 遺伝子中の 32 位のチロシンコドン をアンバーコドンに変異した。発現を検出するため、FLAG ペプチドタグを、ras 遺伝子、ras(WT)、そのアンバー変異体 ras(Am) の C 末端と、大腸菌 TyrRS の C 末端に添加した。

## 【0098】

これらの ras 遺伝子を、CHO 細胞に導入し、それらの産物を、抗 FLAG 抗体を用いた、細胞抽出物のウェスタンブロットにより検出した (図 4)。サプレッサー tRNA の非存在下で、ras(WT) 遺伝子の発現が検出されたが (レーン 1)、ras(Am) の発現は検出されなかった (レーン 2)。これは、細胞内部の固有のサプレッサー活性の欠如を示している。ヒトサプレッサーチロシン tRNA は、バンドの強度 (レーン 3) で検出されるように、ras(Am) 中のアンバー変異を、26% の効率で、サプレッションをおこした。他方で、CUA アンチコドン を有する大腸菌 tRNA<sup>Tyr</sup> (A9G10C25) は、大腸菌からの野生型の TyrRS とともに、サプレッションを起さなかった (レーン 4)。ついで、我々は、ボックス A (G9G10C25) を

生成することができる他のヌクレオチドのセットを用いて、他の大腸菌サプレッサーチロシルtRNA変異体を調べた。このtRNAもサプレッションを、おこすことができなかった。このように、大腸菌サプレッサーチロシルtRNA変異体のボックスAの生成は、サプレッション活性を損ねた。これは、おそらく3次構造が維持できずに、tRNAの成熟またはアミノアシル化の阻害をおこしたためであると考えられた。

#### 【0099】

##### 【発明の効果】

本発明の発現方法によれば、大腸菌由来の上記変異チロシルtRNA合成酵素と、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来の上記サプレッサーtRNAとを発現させた動物細胞において、さらにナンセンス・コドンを実験的に導入した遺伝子を実現させることで、培地中から細胞内に取り込まれた非天然型アミノ酸をナンセンス・コドンの部位に含有したタンパク質を生産することができる。

従来は、生物が培地から取り込んだ非天然型アミノ酸を任意の指定された部位に含有したタンパク質を生産する有効なシステムとしては、大腸菌を用いたシステムしか存在しなかったが、本発明によれば、非天然型アミノ酸を特定の部位に含有したタンパク質を動物細胞で調製することが容易である。ヒトを含めた動物のタンパク質を実現させるには、大腸菌よりも動物細胞が適しており、大腸菌では調製が難しいタンパク質で、非天然型アミノ酸を含有したタンパク質を生産することが可能である。

非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する効用は様々であるが、本発明は、具体的にはヨードチロシンの導入を可能にしており、タンパク質のエックス線結晶解析のための重原子置換の導入や、放射活性のあるヨード原子でタンパク質をラベルすることが可能である。

特に、ヨウ素原子は、NMRによる構造解析において、特徴的なシグナルを発するので、ヨウ素原子を所望の場所に取りこませたタンパク質は、タンパク質の機能及び構造解析の効率化を可能とする。

また、3置換ハロゲン化チロシン取りこみタンパク質は、それ自体で、新たな

生理活性を有する物質となり得るので、新薬またはドラッグデリバリーシステムの開発にも有用であると考えられる。

また、本発明のサプレッサー tRNA 発現ベクターは、動物細胞中のナンセンス変異のサプレッションを可能にするので、ナンセンス変異に関連する疾患などの遺伝子治療に用いられる可能性がある。

【0100】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN; Japan Science and Technology Corporation

<120> A method of expressing a protein in which an unnatural amino acid is incorporated

<140> RJH14-151T

<141> 2002-10-31

<160> 29

<210> 1

<211> 167

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

agcgctccgg tttttctgtg ctgaacctca ggggacgccg acacacgtac acgtcggagg  
ggtagcgaag tggctaaacg cggcggactc taaatccgct ccctttgggt tcggcggttc  
gaatccgtcc ccctccagac aagtgcggtt tttttctcca gctcccg 167



<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

ggaattccat atggcaagca gtaacttgat taaacaattg caag 44

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gccgaagctt gtcgactttc cagcaaata gacagtaatt cttttaccg 50

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

aggatcgaag ccgcaagcga gcgcgatcgg gccttgccg 40

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

aggatcgaag ccgcamnnga gcgcgatcgg gccttgccg 40

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

acggtgtggt gctgtctatt ggtggttctg acc 33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

acggtgtggt gctggcaatt ggtggttctg acc 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

acggtgtggt gctgaacatt ggtggttctg acc 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

acggtgtggt gctgtgcatt ggtggttctg acc 33

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ttcttcggat ccaaccagac tgcgccgcct tc 32

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gatcatctgg ttaacggaga agtgtttgcc 30

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

gaccttcctg tgcgatattg gcaaac 26

<210> 13

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

trgcnnagyn gg 12

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

ggttcgantic c 11

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

agcgagtgtt aaccctgcct 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

cgactacgat attcgcgag 20

<210> 17

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

ccagcagact gg 12

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

ccagcttcct gg 12

<210> 19

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

atgggaacta gtccatagtg gtggaattct gcagatatcc agcacagtgg cggccgccgc  
gtc 63

<210> 20

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

agttcgantc t 11

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

cacagaattc tcgggagctg gagaaaaaaa c 31

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

cacaaagctt agcgctccgg tttttctgtg 30

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

agcgagtgtt aaccctgcct agcgctccgg ttttctgtg 40

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

acacacccag cagactggcg ggagctggag aaaaaaac 38

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

acacacccag cagactggag cgctccggtt tttctgtg 38

<210> 26

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

acacacccag cttcctggcg ggagctggag aaaaaaac 38

<210> 27

<211> 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 27

acacacccag cttcctggag cgctccggtt tttctgtg 38

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 28

ctgcggaat atcgtagtcg cgggagctgg agaaaaaac 40

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 424

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 29

Met Ala Ser Ser Asn Leu Ile Lys Gln Leu Gln Glu Arg Gly Leu

1 5 10 15

Val Ala Gln Val Thr Asp Glu Glu Ala Leu Ala Glu Arg Leu Ala

20 25 30

Gln Gly Pro Ile Ala Leu Tyr Cys Gly Phe Asp Pro Thr Ala Asp

35 40 45



Ser Leu His Leu Gly His Leu Val Pro Leu Leu Cys Leu Lys Arg  
50 55 60

Phe Gln Gln Ala Gly His Lys Pro Val Ala Leu Val Gly Gly Ala  
65 70 75

Thr Gly Leu Ile Gly Asp Pro Ser Phe Lys Ala Ala Glu Arg Lys  
80 85 90

Leu Asn Thr Glu Glu Thr Val Gln Glu Trp Val Asp Lys Ile Arg  
95 100 105

Lys Gln Val Ala Pro Phe Leu Asp Phe Asp Cys Gly Glu Asn Ser  
110 115 120

Ala Ile Ala Ala Asn Asn Tyr Asp Trp Phe Gly Asn Met Asn Val  
125 130 135

Leu Thr Phe Leu Arg Asp Ile Gly Lys His Phe Ser Val Asn Gln  
140 145 150

Met Ile Asn Lys Glu Ala Val Lys Gln Arg Leu Asn Arg Glu Asp  
155 160 165

Gln Gly Ile Ser Phe Thr Glu Phe Ser Tyr Asn Leu Leu Gln Gly  
170 175 180

Tyr Asp Phe Ala Cys Leu Asn Lys Gln Tyr Gly Val Val Leu Gln

185

190

195

Ile Gly Gly Ser Asp Gln Trp Gly Asn Ile Thr Ser Gly Ile Asp

200

205

210

Leu Thr Arg Arg Leu His Gln Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Val

215

220

225

Pro Leu Ile Thr Lys Ala Asp Gly Thr Lys Phe Gly Lys Thr Glu

230

235

240

Gly Gly Ala Val Trp Leu Asp Pro Lys Lys Thr Ser Pro Tyr Lys

245

250

255

Phe Tyr Gln Phe Trp Ile Asn Thr Ala Asp Ala Asp Val Tyr Arg

260

265

270

Phe Leu Lys Phe Phe Thr Phe Met Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala

275

280

285

Leu Glu Glu Glu Asp Lys Asn Ser Gly Lys Ala Pro Arg Ala Gln

290

295

300

Tyr Val Leu Ala Glu Gln Val Thr Arg Leu Val His Gly Glu Glu

305

310

315

Gly Leu Gln Ala Ala Lys Arg Ile Thr Glu Cys Leu Phe Ser Gly

320

325

330

Ser Leu Ser Ala Leu Ser Glu Ala Asp Phe Glu Gln Leu Ala Gln  
 335 340 345

Asp Gly Val Pro Met Val Glu Met Glu Lys Gly Ala Asp Leu Met  
 350 355 360

Gln Ala Leu Val Asp Ser Glu Leu Gln Pro Ser Arg Gly Gln Ala  
 365 370 375

Arg Lys Thr Ile Ala Ser Asn Ala Ile Thr Ile Asn Gly Glu Lys  
 380 385 390

Gln Ser Asp Pro Glu Tyr Phe Phe Lys Glu Glu Asp Arg Leu Phe  
 395 400 405

Gly Arg Phe Thr Leu Leu Arg Arg Gly Lys Lys Asn Tyr Cys Leu  
 410 415 420

Ile Cys Trp Lys  
 424

### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 アンバーコドンに相当する、3-ヨード-L-チロシンのタンパク質への取りこみのための、哺乳類細胞系を示す説明図である。3-ヨード-L-チロシン (IY) は、培地中に、L-チロシン (Y) とともにあるが、細胞中に取りこまれた後、特異的な大腸菌変異体 TyrRS により、B. s. tRNA<sup>Tyr</sup> に結合する。

【図 2】 大腸菌 チロシン tRNA 由来のサプレッサーチロシル tRNA

と、*Bacillus stearothermophilus* の tRNA<sup>Tyr</sup> 由来のサプレッサーチロシン tRNA の配列及び構造を示す。

【図 3】 直列に 9 コピーの *Bacillus stearothermophilus* サプレッサーチロシル tRNA を有するプラスミドの構成を示した図である。

【図 4】 CHO 細胞中のアンバー変異を検出するための、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットのゲルの写真である。

【図 5】 アンバーサプレッションの検出のためのウェスタンブロットの写真である。

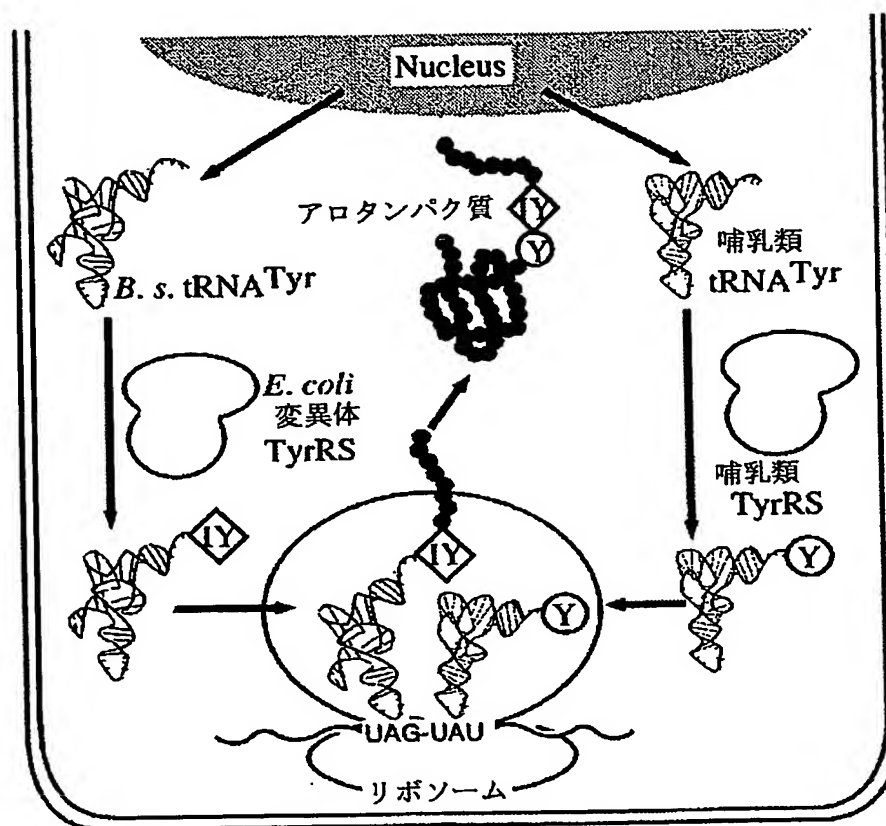
【図 6】 ras 及び ras(Am) 産物の LC-MS 分析の結果を示すグラフである。

【図 7】 Ras タンパク質の 3-ヨード-L-チロシンの取りこみについて、誘導可能なアンバーサプレッションのウェスタンブロットの写真である。

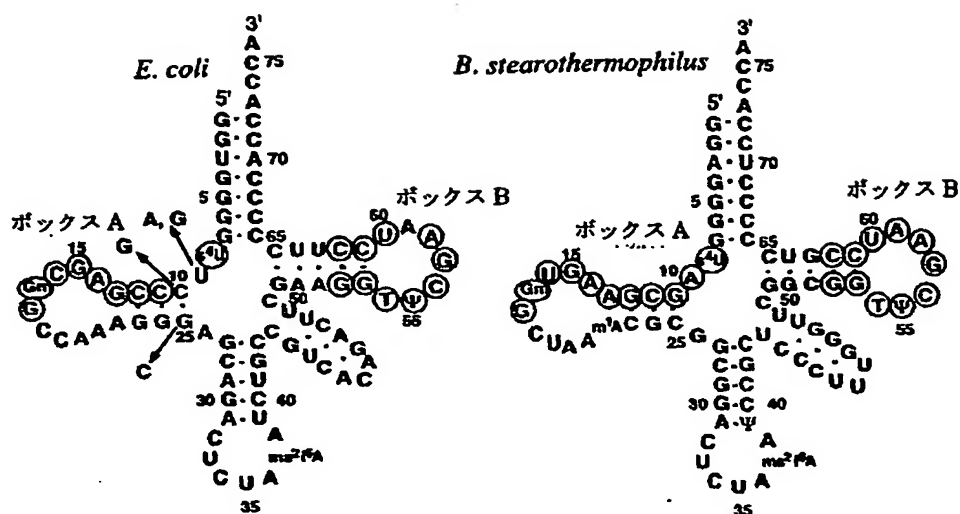
【図 8】 大腸菌の TyrRS (野生型) のアミノ酸配列 (1 文字表記) を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

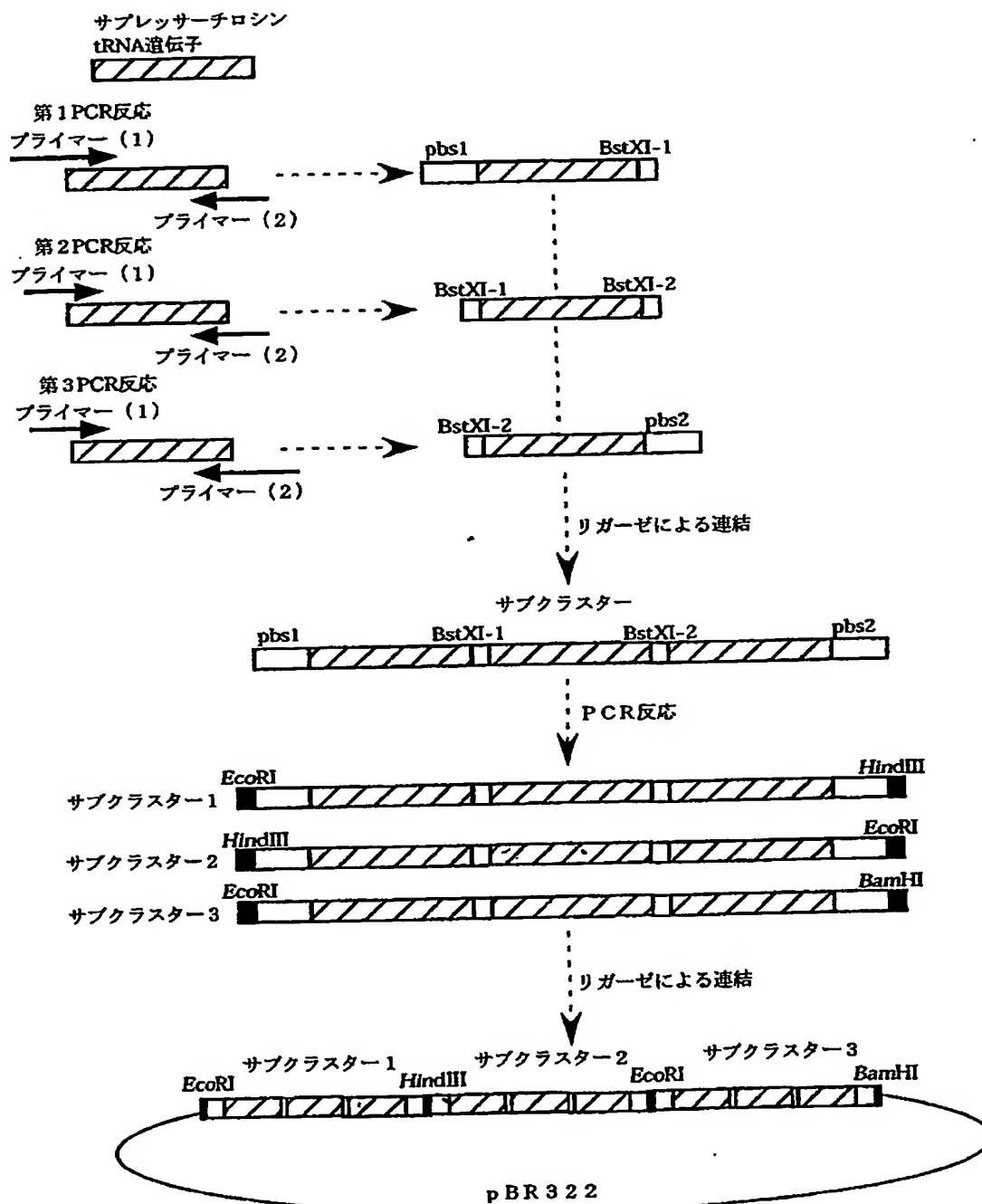


【図2】

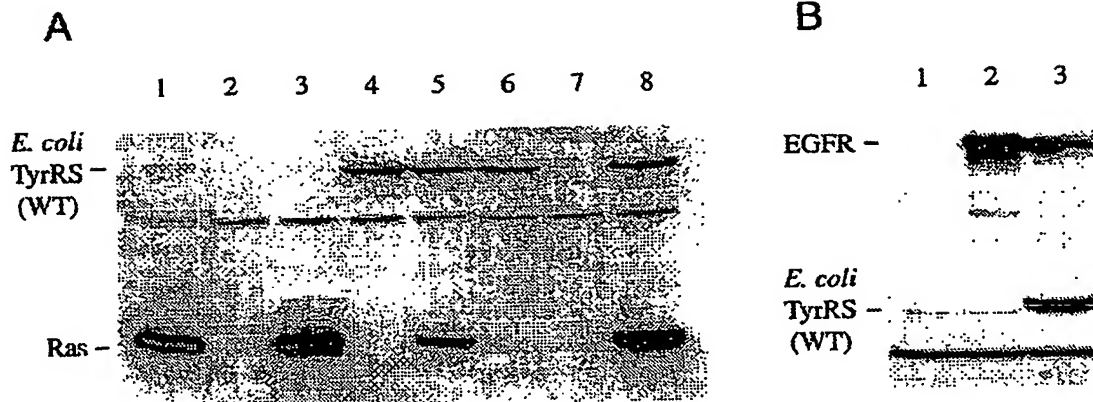


$s^4U$ は4-チオウリジン、 $Gm$ は2'-O-メチルグアノシン、 $ms^2t^6A$ は2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン、 $T$ は5-メチルウリジン、 $\Psi$ はシュードウリジン、 $m^1A$ は1-メチルアデノシンを示す。

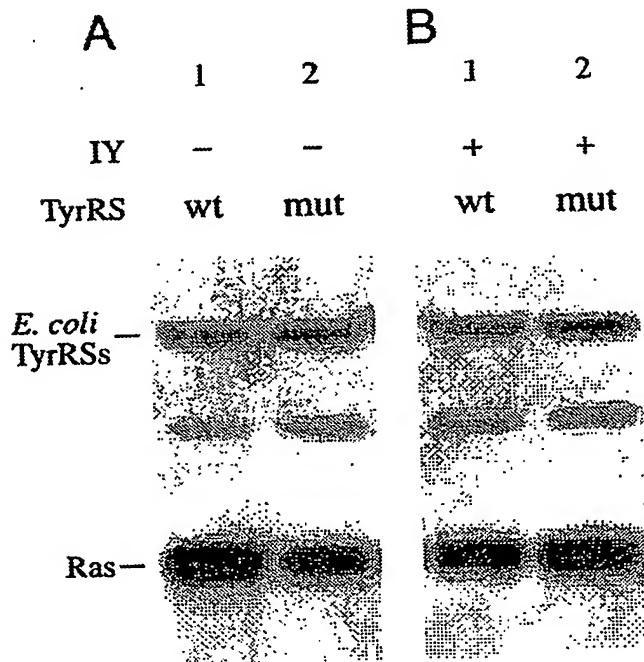
【図3】



【図 4】

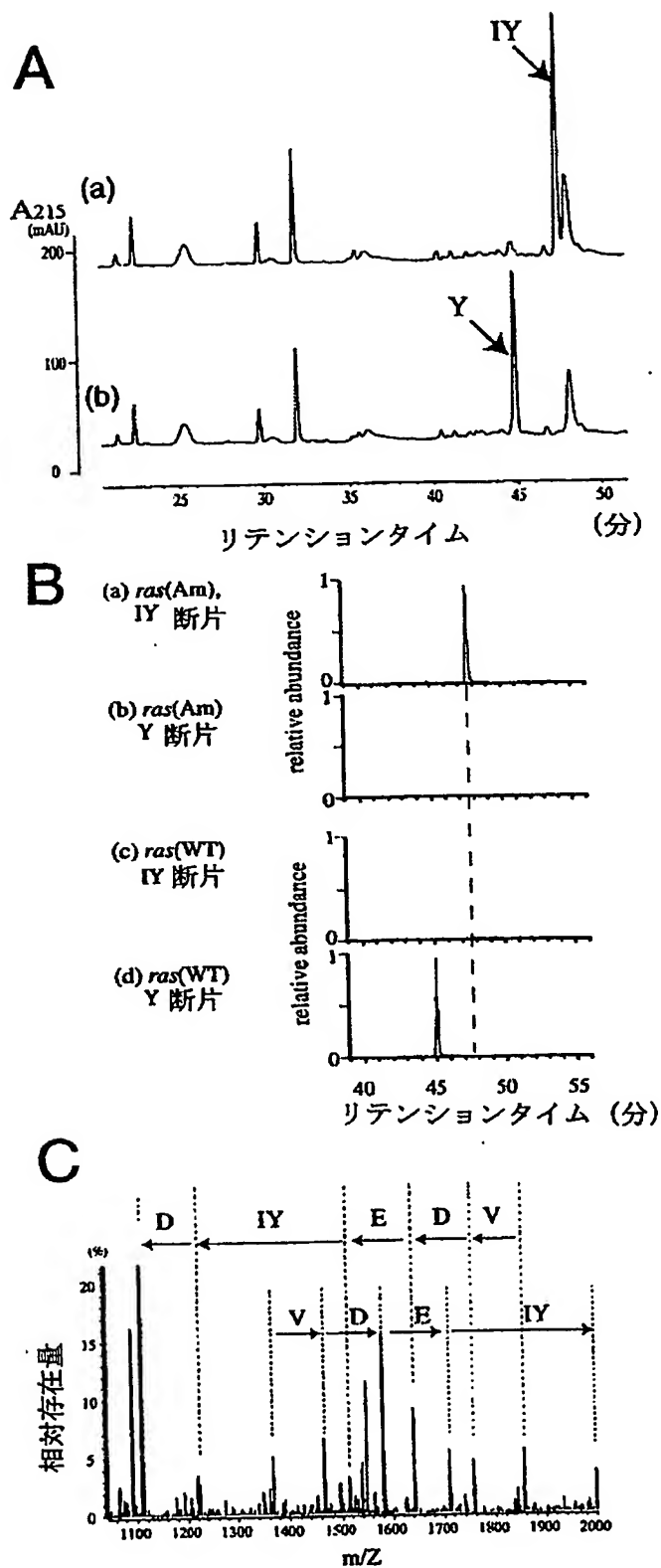


【図 5】

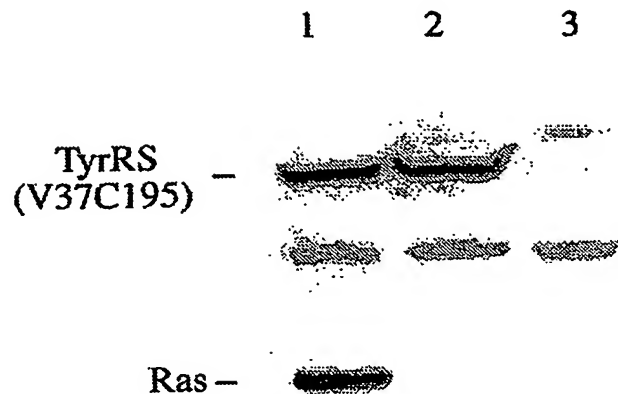




【図 6】



【図7】



【図8】

MASSNLIKQL	QERGLVAQVT	DEEALAERLA	30
QGPIALYCGF	DPTADSLHLG	HLVPLLCLKR	60
FQQAGHKPVA	LVGGATGLIG	DPSFKAAERK	90
LNTEETVQEW	VDKIRKQVAP	FLDFDCGENS	120
AIAANNYDWF	GNMNVLTFLR	DIGKHFSVNQ	150
MINKEAVKQR	LNREDQGISF	TEFSYNLLQG	180
YDFACLNKQY	GVVLQIGGSD	QWGNITSGID	210
LTRRLHQNQV	FGLTVPLITK	ADGTKFGKTE	240
GGAVWLDPKK	TSPYKFYQFW	INTADADVYR	270
FLKFFTFMSI	EEINALEEED	KNSGKAPRAQ	300
YVLAEQVTRL	VHGEEGLQAA	KRITECLFSG	330
SLSALSEADF	EQLAQDGVPM	VEMEKGADLM	360
QALVDSELQP	SRGQARKTIA	SNAITINGEK	390
QSDPEYFFKE	EDRLFGRFTL	LRRGKKNYCL	420
ICWK			424

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 動物細胞内でアロタンパク質の発現系の提供。

【解決手段】 (A) 大腸菌由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素と、(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA と、(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法。

【選択図】 なし

**【書類名】** 出願人名義変更届 (一般承継)  
**【整理番号】** 9834  
**【提出日】** 平成15年10月22日  
**【あて先】** 特許庁長官殿  
**【事件の表示】**  
**【出願番号】** 特願2002-318846  
**【承継人】**  
**【識別番号】** 503359821  
**【住所又は居所】** 埼玉県和光市広沢2番1号  
**【氏名又は名称】** 独立行政法人理化学研究所  
**【承継人代理人】**  
**【識別番号】** 100075812  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 吉 武 賢 次  
**【提出物件の目録】**  
**【物件名】** 権利の承継を証明する書面 1  
**【提出物件の特記事項】** 手続補足書で提出します。  
**【物件名】** 委任状 1  
**【提出物件の特記事項】** 手続補足書で提出します。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-318846
受付番号	50301752796
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成16年 2月 2日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503359821
【住所又は居所】	埼玉県和光市広沢2番1号
【氏名又は名称】	独立行政法人理化学研究所

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100075812
【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内3-2-3 協和特許法律事務所
【氏名又は名称】	吉武 賢次

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
【提出日】 平成15年10月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2002-318846  
【承継人】  
【識別番号】 503360115  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代表者】 沖村 憲樹  
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。  
  
【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 2 - 3 1 8 8 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 6 7 9 2 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

氏 名

理化学研究所

特願 2002-318846

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

科学技術振興事業団



特願 2002-318846

出願人履歴情報

識別番号

[503359821]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名

独立行政法人理化学研究所

特願 2 0 0 2 - 3 1 8 8 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

### **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**